

Process for the manufacture of a biosensor employing an enzyme as active molecule, and biosensor obtained by this process

Patent Number: FR2682765
Publication date: 1993-04-23
Inventor(s): ANDRE BARRAUD; JEAN-MARC VALLETON; YVES PERRIN; CATHERINE FIOL
Applicant(s):: COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE (FR); BIOTICA INTERNATIONAL (FR); CENTRE NAT RECH SCIENT (FR)
Requested Patent: ☐ [FR2682765](#)
Application Number: FR19910012764 19911016
Priority Number(s): FR19910012764 19911016
IPC Classification: C12Q1/26 ; C12Q1/58 ; G01N27/327
EC Classification: [C12Q1/00B](#), [C12Q1/00B2](#)
Equivalents:

Abstract

To prepare a biosensor comprising an insulating support 1 provided with a conductive film 4 acting as electrodes, on which a layer 5 is arranged comprising active molecules A, for example glucose peroxidase, a monomolecular layer of amphiphilic molecules B coupled with the molecules A is deposited on the support provided with the conductive film 4. The Langmuir Blodgett method is employed for this purpose with a bath containing the molecules A and a compression of the monomolecular layer formed on the bath is carried out, with a view to its deposition on the support, with a high surface tension P, for example of 45 mN/m. This makes it possible to obtain a compact organisation of the molecules A and to make them more accessible to the compound to be detected. The performance of the biosensor can be improved further by

carrying out a surface treatment of the film 4 before the deposition of the layer 5. 

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 682 765

(21) N° d'enregistrement national : 91 12764

(51) Int Cl⁸ : G 01 N 27/327, C 12 Q 1/26, 1/58

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 16.10.91.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE
ATOMIQUE Etablissement de Caractère Scientifique,
Technique et Industriel — FR, CENTRE NATIONAL
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE BIOTICA
INTERNATIONAL Société anonyme — FR et BIOTICA
INTERNATIONAL Société anonyme — FR.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 23.04.93 Bulletin 93/16.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

(72) Inventeur(s) : Barraud André, Valleton Jean-Marc,
Perrin Yves et Fiol Catherine.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Brevatome.

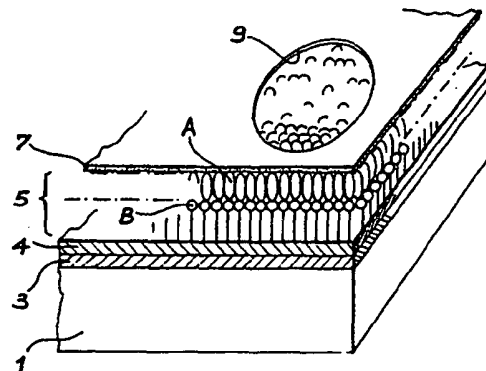
(54) Procédé de fabrication d'un biocapteur utilisant une enzyme comme molécule active, et biocapteur obtenu par ce procédé.

(57) L'invention concerne un procédé de fabrication d'un biocapteur.

Pour préparer un biocapteur comportant un support isolant 1 muni d'un film conducteur 4 jouant le rôle d'électrodes sur lequel est disposée une couche 5 comportant des molécules actives A, par exemple de glucose peroxydase, on dépose sur le support muni du film conducteur 4 une couche monomoléculaire de molécules amphiphiles B couplées aux molécules A. Dans ce but, on utilise la méthode de Langmuir Blodgett avec un bain contenant les molécules A, et on réalise une compression de la couche monomoléculaire formée sur le bain, en vue de son dépôt sur le support, à une tension superficielle P élevée, par exemple de 45mN/m.

Ceci permet d'obtenir une organisation compacte des molécules A et de les rendre plus accessibles au composé à détecter.

On peut encore améliorer les performances du biocapteur en effectuant un traitement de surface du film 4 avant le dépôt de la couche 5.



FR 2 682 765 - A1

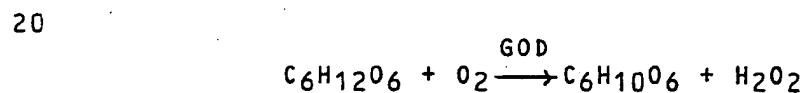


Procédé de fabrication d'un biocapteur utilisant une enzyme comme molécule active, et biocapteur obtenu par ce procédé.

5 La présente invention a pour objet un procédé de fabrication d'un biocapteur et le biocapteur obtenu par ce procédé.

De façon plus précise, elle concerne des biocapteurs capables de détecter un composé
10 tel que le glucose, dans un échantillon de liquide, au moyen de molécules biologiquement actives constituées par des enzymes qui jouent le rôle de catalyseur pour une réaction chimique du composé à détecter.

15 Dans le cas d'un biocapteur capable de détecter du glucose, on peut utiliser comme molécule biologiquement active de la glucose oxydase (GOD) qui catalyse l'oxydation chimique du glucose conformément à la réaction :



La quantité de peroxyde d'hydrogène produite par cette réaction peut être déterminée par
25 des moyens électriques, par exemple au moyen d'un système d'électrodes, comme il est décrit par Moriizumi dans Thin Solid Films, 160, 1988, p. 413-429.

Le biocapteur décrit dans ce document
30 comprend un support muni de films électriquement conducteurs jouant le rôle d'électrodes, associés à des molécules de glucose oxydase. Les molécules de glucose oxydase ont été déposées sur le support muni d'électrodes par adsorption sur des couches
35

monomoléculaires de molécules amphiphiles telles que l'acide arachidique. Avec ce biocapteur, les meilleurs résultats sont obtenus lorsqu'on utilise dix couches monomoléculaires d'acide arachidique.

5 Dans un biocapteur de ce type, la partie active est une molécule ou un groupe de molécules (enzymes) douées d'une haute spécificité pour effectuer une reconnaissance moléculaire du composé à détecter, puis une réaction chimique de ce composé.

10 Ainsi, le rôle des couches monomoléculaires est triple. En effet, elles servent

1°) à immobiliser les molécules actives (enzymes) et les empêcher de quitter le biocapteur,

2°) elles assurent une disposition des
15 molécules actives dans une position convenable pour qu'elles puissent agir sur le composé à détecter, et

3°) elles doivent rendre le support, c'est-à-dire le film conducteur, inaccessible à
20 des espèces indésirables présents dans l'atmosphère ou dans l'échantillon, mais doivent laisser passer les espèces produites par la réaction chimique du composé à détecter afin de pouvoir doser la quantité d'espèces produites par cette réaction.

25 Or, dans ce biocapteur connu, les molécules d'enzymes sont incluses entre les couches monomoléculaires, si bien qu'il est nécessaire d'avoir une diffusion de la solution à l'intérieur de la couche active du biocapteur, ce qui ne permet pas d'éviter
30 les réactions parasites provenant d'espèces indésirables atteignant le film conducteur jouant le rôle d'électrode.

La présente invention a précisément pour objet un procédé de fabrication d'un biocapteur

utilisant également une couche monomoléculaire de Langmuir-Blodgett, qui permet d'obtenir un biocapteur plus fiable et moins sensible aux espèces indésirables.

5 Selon l'invention, le procédé de fabrication d'un biocapteur capable de détecter un composé, comprenant un support muni d'un film électriquement conducteur revêtu de molécules A d'une enzyme capable
10 de catalyser une réaction chimique du composé à détecter, se caractérise en ce que les molécules A sont sous la forme d'une seule couche monomoléculaire déposée sur le support muni du film conducteur et en ce que cette couche monomoléculaire est obtenue en réalisant les étapes successives suivantes :

15 a) introduire dans le bain d'une cuve de Langmuir les molécules A d'enzyme,

20 b) disperser sur la surface du bain des molécules amphiphiles B capables de réagir avec ou d'adsorber les molécules A,

25 c) comprimer la couche monomoléculaire des molécules B couplées aux molécules d'enzyme A provenant du bain, à une tension superficielle P supérieure à la tension superficielle que peut supporter un film des molécules A, et

 d) déposer sur le support muni du film conducteur la couche monomoléculaire ainsi comprimée.

30 Dans ce procédé, le fait d'appliquer sur la couche monomoléculaire de molécules B une tension superficielle P supérieure à la tension superficielle que peut supporter un film des molécules A, permet de faire sortir les molécules A de la couche monomoléculaire de molécules B et de les rendre ainsi plus accessibles, tout en obtenant

35

une organisation plus compacte de ces molécules A sur la surface de la couche monomoléculaire des molécules B.

5 Bien entendu, pour obtenir cette organisation, la tension superficielle P doit être inférieure à la tension superficielle de destruction de la couche monomoléculaire des molécules B.

10 De la sorte, sous l'effet de cette tension superficielle élevée, les molécules A, pour des raisons énergétiques, sont amenées à se serrer les unes contre les autres à la surface de la couche monomoléculaire, la surface de cette couche étant réduite pratiquement à celle des molécules B à 10% près.

15 Ainsi, on obtient une configuration plus serrée dans laquelle les molécules actives A sont immobilisées mais disposées dans une position appropriée pour réagir avec le composé à détecter. Par ailleurs, cette structure compacte rend plus difficile l'accès d'espèces indésirables au film conducteur sous-jacent.

20 Dans ce procédé, la tension superficielle P appliquée dépend de la nature des molécules A et des molécules B puisqu'elle doit être supérieure à celle que peut supporter un film des molécules A, tout en restant inférieure à la tension superficielle de dégradation d'un film des molécules B. Généralement, elle est au moins égale à 35mN/m, par exemple de 40 à 45mN/m.

30 De préférence, pour ne pas abimer la couche monomoléculaire de molécules B, on réalise la compression de cette couche lentement, par exemple en deux stades, en appliquant dans le premier stade une tension superficielle inférieure à P et en

35

appliquant dans le deuxième stade la tension superficielle P.

Dans ce procédé, les molécules A sont choisies en fonction du composé à détecter. A titre d'exemples, les molécules A peuvent être par exemple la glucose oxydase ou l'uréase.

Les molécules B sont des molécules, organiques, amphiphiles, possédant une partie hydrophobe, c'est-à-dire ayant une répulsion pour les liquides polaires tels que l'eau, et une partie hydrophile, c'est-à-dire ayant une affinité pour les liquides polaires tels que l'eau. Par ailleurs, pour être utilisables dans l'invention, les molécules B doivent pouvoir être déposées sur un support sous la forme d'une couche monomoléculaire par la méthode de Langmuir-Blodgett, et pouvoir être couplées aux molécules A par réaction chimique ou adsorption. Les molécules susceptibles de convenir sont en particulier décrites dans le document EP-A- 0 170 535.

A titre d'exemples de telles molécules, on peut citer les amines aliphatiques portant au moins une chaîne aliphatique en C₁₈ à C₂₄, les acides gras saturés ou insaturés en C₁₈ à C₂₄ et les alcools et les urées portant au moins une chaîne aliphatique en C₁₈ à C₂₄.

Avec la glucose oxydase ou l'uréase, on peut utiliser en particulier l'acide béhénique ou la distéarylamine.

Selon un mode de réalisation préféré du procédé de l'invention permettant d'améliorer encore les performances du biocapteur, on soumet tout d'abord le support muni du film conducteur jouant le rôle d'électrode, à un traitement de

35

surface, avant de déposer sur celui-ci la couche monomoléculaire des molécules B couplées aux molécules A.

5 Ce traitement de surface a pour but d'éliminer l'influence néfaste sur la sensibilité et la fiabilité du biocapteur, de trous et/ou d'impuretés présentes dans le film conducteur.

10 En effet, la présence de tels défauts dans le film conduit à des imperfections dans la couche monomoléculaire déposée ensuite, ce qui ne permet pas d'avoir une bonne présentation des molécules actives A et peut rendre la couche perméable à l'eau et à des espèces indésirables donnant des signaux électriques parasites.

15 Pour supprimer l'effet néfaste de trous et/ou d'impuretés sur le film, on effectue le traitement de surface de façon à recouvrir les défauts (trous et impuretés) d'une couche supprimant la conduction électrique au niveau de ces défauts et empêchant de générer par épitaxie un défaut dans la couche monomoléculaire qui sera plus tard déposée.

20 Généralement, le film conducteur est en or ou en platine et il est déposé sur une sous-couche de métal pour constituer sur la surface du support un jeu d'électrodes ayant par exemple la forme d'un circuit imprimé.

25 La présence de la sous-couche de métal, par exemple de cuivre permet de réaliser le dépôt par électrolyse dans de bonnes conditions.

30 Avec une telle sous-couche, le traitement de surface peut consister en un traitement d'oxydation électrolytique effectué à un potentiel suffisant pour oxyder le métal de la sous-couche et former

ainsi au niveau des trous une couche d'oxyde semi-conducteur.

Lorsque le métal de la sous-couche est du cuivre, on peut appliquer par exemple sur l'électrode (film conducteur) qui sert d'anode, une tension de + 1,1V par rapport à une électrode standard au calomel, pendant des durées allant de 1 à 5min.

On peut compléter, si on le désire, ce traitement électrolytique en formant de plus une couche mince isolante sur les parties du film conducteur où le métal de la sous-couche a été oxydé.

Pour obtenir cette couche isolante uniquement sur les parties du film où le métal de la sous-couche a été oxydé, on peut utiliser un composé capable de réagir avec l'oxyde du métal de la sous-couche pour former un composé isolant insoluble, par exemple un sel du métal.

Ainsi, lorsque la sous-couche est en cuivre, on peut réaliser une étape de chimisorption en adsorbant un composé acide tel que l'acide stéarique qui forme au contact de l'oxyde de cuivre un sel de cuivre insoluble. Ceci peut être effectué en immergeant le support, soumis tout d'abord à l'oxydation électrolytique, dans une solution d'acide stéarique.

On peut encore réaliser le traitement de surface en soumettant le film conducteur à l'action d'un plasma gazeux, qui permet de modifier chimiquement les impuretés présentes dans le film conducteur pour les passiver. Le plasma peut être un plasma d'azote, d'oxygène ou d'argon.

On peut encore réaliser le traitement de surface en déposant sur la totalité du film conducteur une couche organique isolante et en

dissolvant ensuite cette couche, sauf sur les parties du film conducteur qui correspondent à des trous. La couche isolante peut être une couche de polymère et la dissolution de la couche peut être ensuite effectuée en immergeant le support revêtu de la
5 couche de polymère dans un solvant pendant un temps limité, de façon que le solvant n'ait pas le temps de pénétrer dans les trous pour y dissoudre le polymère.

10 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples suivants donnés bien entendu à titre illustratif et non limitatif en référence au dessins annexé sur lequel

- 15 - la figure 1 représente de façon schématique un biocapteur conforme à l'invention, et
- la figure 2 illustre de façon schématique un mode de traitement du support par un plasma.

20 Sur la figure 1, on a représenté en perspective et en coupe verticale le biocapteur de l'invention, la coupe étant effectuée sur une partie du support munie d'un film conducteur.

Sur cette figure, on voit que le biocapteur comprend un support isolant 1, par exemple en résine
25 époxy ou en verre, dont certaines parties sont revêtues d'une sous-couche 3 de cuivre et d'un film conducteur 4 d'or.

30 Sur le film conducteur d'or est disposée une couche monomoléculaire 5 de molécules amphiphiles B couplées à des molécules A d'enzyme qui sont les molécules biologiquement actives du biocapteur.

En effet, lorsque les molécules A seront en contact avec un échantillon liquide contenant le composé à détecter, par exemple du glucose,

elles catalyseront l'oxydation du glucose, ce qui conduira à la production d'eau oxygénée. La quantité d'eau oxygénée produite par cette réaction pourra être ensuite détectée par mesure du courant électrique passant entre l'électrode d'or 4 et une autre électrode d'or similaire disposée sur le support 1.

Généralement, l'ensemble du biocapteur est recouvert d'un film isolant protecteur 7, par exemple en vernis cellulosique, protégeant l'ensemble mais percé d'un orifice 9 pour l'introduction d'une goutte de l'échantillon à analyser permettant la mise en contact de cet échantillon avec la couche comportant les molécules actives A.

On précise que le biocapteur pourra être associé pour la mesure à un boîtier comportant des éléments appropriés pour effectuer cette mesure.

Les exemples qui suivent, illustrent la réalisation de biocapteurs de ce type par le procédé de l'invention.

Exemple 1 : Préparation d'un biocapteur utilisant l'uréase comme molécule biologiquement active.

Pour réaliser ce biocapteur, on part d'un support sur lequel a été déposée une sous-couche de cuivre revêtue d'un film d'or, selon une configuration correspondant aux électrodes nécessaire pour la mesure. Le dépôt d'or a été effectué par une méthode électrolytique en se servant de la sous-couche de cuivre pour amener le courant et limiter automatiquement le dépôt à la surface occupée par la sous-couche de cuivre.

A la suite de ce dépôt, quel que soit le soin pris et l'épaisseur de dépôt, il rest des défauts de couverture localisés (trous d'épingles) qui, si petits soient-ils, risquent d

perturber le biocapteur.

Aussi, on soumet tout d'abord le support muni du film conducteur à un traitement de surface pour éliminer l'effet néfaste de ces trous et/ou des impuretés éventuelles présentes dans le film d'or.

Dans ce but, on dépose un polymère isolant sur la totalité de la surface du support et on le dissout ensuite, sauf sur les emplacements qui correspondent aux défauts.

Ceci est effectué en immergeant le support muni du film conducteur d'or, pendant 20min, dans une solution à 1% de vernis cellulosique dans l'acétate d'éthyle, puis en le séchant, et en l'immergeant ensuite sous agitation, pendant 40s, dans un mélange d'acétone et d'acétate d'éthyle (1:1 en volume) suivi immédiatement d'un séchage au pistolet d'air ou d'azote comprimé.

Lors de la dernière phase d'immersion, on a dissous la couche de vernis cellulosique sauf dans les trous car cette immersion a duré trop peu de temps pour que le solvant puisse pénétrer dans les trous.

Après ce traitement de surface, on dépose sur le support une couche monomoléculaire de distéarylamine (molécule B) couplée à l'uréase (molécule A).

Dans ce but, on remplit une cuve de Langmuir d'eau pure contenant 10^{-7} mol/l d'uréase, puis on répand sur la surface de l'eau une solution à 5.10^{-4} mol/l de distéarylamine dans du chloroforme. Après 20min, c'est-à-dire le temps nécessaire pour coupler l'uréase à la distéarylamine, on comprime lentement la couche de distéarylamine et d'uréase

sur la surface de l'eau jusqu'à 20mN/m, puis jusqu'à 42mN/m. On transfère ensuite la couche ainsi comprimée sur le support qui a été soumis préalablement au traitement de surface. Ceci peut être effectué en immergeant le support dans le bain et en l'extrayant ensuite du bain à travers une zone de la cuve sans film pour obtenir le dépôt d'une seule couche monomoléculaire.

Les caractéristiques du biocapteur ainsi obtenu sont meilleures que celles d'un biocapteur préparé sans effectuer un traitement de surface du support.

En effet, le courant transitoire du biocapteur qui est déterminé en immergeant celui-ci dans une solution de sérum physiologique à 0,1mol/l de KCl en l'absence d'urée, et qui correspond donc au courant dû à l'oxydation électrolytique d'impuretés, est réduit d'un facteur supérieur à 100 grâce au traitement de surface.

Lorsqu'on utilise le biocapteur dans une mini cellule remplie d'une solution d'urée et que l'on observe l'évolution du pH par conductimétrie, on remarque que l'augmentation de la conductivité de la solution est beaucoup plus rapide avec ce biocapteur qu'avec un biocapteur dans lequel on aurait réalisé la compression de la couche monomoléculaire seulement à 20mN/m.

Exemple 2 : Préparation d'un biocapteur utilisant l'uréase comme molécule biologiquement active.

Dans cet exemple, on utilise le même support que dans l'exemple 1 et on le soumet au même traitement de surface. On dépose ensuite sur le support ainsi traité, une couche monomoléculaire d'acide béhénique couplée à de l'uréase en opérant

de la façon suivante.

On remplit une cuve de Langmuir d'eau pure contenant 10^{-8} mol/l d'uréase, puis on disperse sur la surface de l'eau de la cuve une solution à 5.10^{-4} mol/l d'acide b \acute{e} h \acute{e} nique dans du chloroforme. Après 1h, on comprime lentement la couche monomoléculaire d'acide b \acute{e} h \acute{e} nique et d'uréase formée sur la surface de l'eau jusqu'à une tension superficielle de 30mN/m, puis jusqu'à 45mN/m. On transfère ensuite la couche sur le support muni du film conducteur d'or soumis au traitement de surface.

Lorsqu'on immerge ce biocapteur dans une mini cellule remplie d'une solution d'urée et que l'on observe l'augmentation du pH par pH métrie, la vitesse d'augmentation du pH de la solution est environ 10 fois plus rapide qu'avec un biocapteur produit dans les mêmes conditions mais en comprimant uniquement la couche à 30mN/m.

Exemple 3 : Préparation d'un biocapteur à l'uréase.

On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 2, sauf que l'on utilise pour le dépôt de la couche monomoléculaire, une cuve de Langmuir remplie d'eau pure contenant 10^{-7} mol/l d'uréase et que l'on attend seulement 10min après épandage de la solution chloroformique d'acide b \acute{e} h \acute{e} nique pour réaliser la compression lente de la couche monomoléculaire à 30mN/m, puis 45mN/m.

Dans ces conditions, on obtient sensiblement les mêmes résultats qu'avec le biocapteur de l'exemple 2.

Exemple 4 : Préparation d'un biocapteur utilisant la glucose oxydase (GOD) comme molécule biologiquement active.

Dans cet exemple, on utilise un support

revêtu d'un film d'or déposé sur une sous-couche de cuivre, selon le dessin correspondant aux électrodes et l'on soumet préalablement le support revêtu du film d'or à un traitement de surface consistant en une oxydation électrolytique.

Dans ce but, on immerge le support revêtu du film d'or dans une solution de KCl à 0,1M, on applique aux électrodes jouant le rôle d'anode une tension de +1,1V par rapport à une électrode standard au calomel, pendant 3min, et on réalise de la même façon plusieurs cycles oxydation - réduction, pour oxyder le cuivre de la sous couche dans les trous d'épingles du film d'or.

Après ce traitement de surface, on dépose sur le film d'or, une seule couche monomoléculaire d'acide béhénique couplé à la glucose oxydase.

Dans ce but, on remplit une cuve de Langmuir d'eau pure contenant 10^{-7} mol/L de GOD, puis on répand sur la surface du bain une solution à 5.10^{-4} mol/L d'acide béhénique dans du chloroforme. Après 10min, on comprime lentement la couche d'acide béhénique ayant adsorbé la glucose oxydase jusqu'à 30mN/m, puis jusqu'à 45mN/m.

On transfère alors la couche sur le support soumis préalablement au traitement de surface.

On teste ensuite la fiabilité du biocapteur en immergeant celui-ci dans une solution de glucose et en détectant le peroxyde d'hydrogène formé par oxydation du glucose, par colorimétrie à l'aide de peroxydase et d'orthodianizidène. On obtient une sensibilité très satisfaisante.

Par ailleurs, on détermine le courant transitoire du biocapteur par immersion de celui-ci dans du sérum physiologique à 0,1mol/L de KCl

en l'absence de glucose, et on note que ce courant transitoire est réduit d'un facteur supérieur à 5 par rapport au même biocapteur n'ayant subi aucun traitement de surface du support.

5 Exemple 5 : Préparation d'un biocapteur utilisant la glucose oxydase (GOD) comme molécule biologiquement active.

10 Dans cet exemple, on utilise un support revêtu d'un film d'or déposé sur une sous-couche de cuivre, selon le dessin correspondant aux électrodes et l'on soumet préalablement le support revêtu du film d'or à un traitement de surface consistant en une oxydation électrolytique suivie d'un dépôt isolant.

15 Dans ce but, on immerge le support revêtu du film d'or dans une solution de KCl à 0,1M et on applique aux électrodes jouant le rôle d'anode une tension de +1,1V par rapport à une électrode standard au calomel, pendant 3min, et on réalise
20 de la même façon plusieurs cycles oxydation - réduction, pour oxyder le cuivre de la sous couche dans les trous d'épingles du film d'or.

Après cette oxydation, on immerge le support dans une solution à 1% d'acide stéarique
25 dans du chloroforme pendant 20min, puis on le rince au chloroforme pur.

Avec ce traitement, on a ainsi transformé l'oxyde de cuivre en stéarate de cuivre isolant.

30 Après ce traitement de surface, on dépose sur le film d'or, une seule couche monomoléculaire de distéarylamine couplé à la glucose oxydase.

Dans ce but, on remplit une cuve de Langmuir d'eau pure contenant 10^{-7} mol/l de GOD, puis on répand sur la surface du bain une solution
35

à 5.10^{-4} mol/l de distéarylamine dans du chloroforme. Après 20min, on comprime lentement la couche de distéarylamine ayant adsorbé la glucose oxydase jusqu'à 20mN/m, puis jusqu'à 42mN/m.

5 On transfère alors la couche sur le support soumis préalablement au traitement de surface.

On teste ensuite la fiabilité du biocapteur en immergeant celui-ci dans une solution de glucose et en détectant le peroxyde d'hydrogène formé par oxydation du glucose, par colorimétrie à l'aide de peroxydase et d'orthodianizidène. On obtient une sensibilité très satisfaisante.

10 Par ailleurs, on détermine le courant transitoire du biocapteur par immersion de celui-ci dans du sérum physiologique à 0,1mol/l de KCl en l'absence de glucose, et on note que ce courant transitoire est réduit d'un facteur supérieur à 20 par rapport au même biocapteur n'ayant subi aucun traitement de surface du support.

20 Exemple 6 : Biocapteur à la glucose oxydase.

Dans cet exemple, on utilise un support muni d'un film d'or, disposé sur une sous-couche de cuivre, que l'on soumet à un traitement de surface consistant à déposer du vernis cellulosique dans les trous du film d'or en suivant le même mode opératoire que dans l'exemple 1.

25 Après ce traitement, on dépose sur le film d'or une couche monomoléculaire d'acide béhénique couplé à la GOD, en opérant de la façon suivante.

30 On remplit une cuve de Langmuir d'eau pure contenant en solution 10^{-7} mol/l de GOD, puis on répand sur la surface du bain une solution à 5.10^{-4} mol/l d'acide béhénique dans du chloroforme. Après 10min, on comprime lentement la couche monomo-

35

léculaire jusqu'à 30mN/m, puis jusqu'à 45mN/m. On la transfère ensuite sur le support revêtu du film d'or et soumis au traitement de surface.

On teste ensuite l'efficacité du biocapteur, en immergeant celui-ci dans une solution de glucose et en détectant par ampérométrie sous une polarisation de 0,6V par rapport à une électrode standard au calomel, la quantité de peroxyde d'hydrogène formée. Le courant est nettement plus élevé que ceux obtenus avec des biocapteurs dont la couche monomoléculaire a été comprimée seulement à 20mN/m. Par ailleurs, la linéarité de la réponse en fonction de la concentration en glucose est beaucoup plus large. On remarque aussi que ce biocapteur qui ne comprend qu'une seule couche, a un meilleur fonctionnement que le biocapteur à plusieurs couches de l'art antérieur.

Enfin, la réalisation du traitement de surface permet d'obtenir une réduction d'un facteur supérieur à 100 du courant transitoire observé en l'absence de glucose.

Exemple 7 : Biocapteur à la glucose oxydase.

Dans cet exemple, on suit le même mode opératoire que dans l'exemple 6 mais on réalise le traitement de surface du support par action d'un plasma d'azote au lieu d'effectuer un dépôt de vernis cellulosique.

L'installation de traitement par plasma est représentée schématiquement sur la figure 2.

Dans cette installation, on crée un plasma d'azote entre un filament 21 jouant ce rôle de cathode porté à 4750V par rapport à une anode 23 à la masse située à une distance d égale à 3 à 4cm de la cathode 21. On dispose le support

17

à traiter latéralement à une distance D de 9,5cm de l'axe de la chambre à plasma.

Après une purge de 5min sous courant d'azote, on règle la pression d'azote pour que
5 le courant soit de 200 μ A et on réalise le traitement pendant 20min.

Après ce traitement, on dépose la couche d'acide b \acute{e} hénique - glucose oxydase de la même manière que dans l'exemple 6.

10 On obtient ainsi un biocapteur dont le courant transitoire est réduit d'un facteur 100 par rapport au même biocapteur n'ayant subi aucun traitement thermique.

15

20

25

30

35

REVENDICATIONS

1. Procédé de fabrication d'un biocapteur capable de détecter un composé, comprenant un support muni d'un film électriquement conducteur revêtu de molécules A d'une enzyme capable de catalyser
5 une réaction chimique du composé à détecter, caractérisé en ce que les molécules A sont sous la forme d'une seule couche monomoléculaire déposée sur le support muni du film conducteur et en ce que cette couche monomoléculaire est obtenue en réalisant
10 les étapes successives suivantes :

a) introduire dans le bain d'une cuve de Langmuir les molécules A d'enzyme,

b) disperser sur la surface du bain des molécules amphiphiles B capables de réagir avec
15 ou d'adsorber les molécules A,

c) comprimer la couche monomoléculaire des molécules B couplées aux molécules d'enzyme A provenant du bain, à une tension superficielle P supérieure à la tension superficielle que peut
20 supporter un film des molécules A, et

d) déposer sur le support muni du film conducteur la couche monomoléculaire ainsi comprimée.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la tension superficielle P est au moins égale à 35mN/m.
25

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que P est de 40 à 45mN/m.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'on
30 réalise la compression de la couche monomoléculaire des molécules B couplées aux molécules A en deux stades, en appliquant dans le premier stade une

tension superficielle inférieure à P et en appliquant dans le deuxième stade la tension superficielle P.

5 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les molécules A sont la glucose oxydase ou l'uréase.

10 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les molécules amphiphiles B sont choisies parmi les amines aliphatiques portant au moins une chaîne aliphatique en C₁₈ à C₂₄, les acides gras, saturés ou insaturés en C₁₈ à C₂₄, les alcools et les urées portant au moins une chaîne aliphatique en C₁₈ à C₂₄.

15 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'on soumet le support muni du film conducteur à un traitement de surface pour éliminer l'influence néfaste de trous et/ou d'impuretés dans ce film,
20 avant d'effectuer sur celui-ci le dépôt de la couche monomoléculaire.

25 8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le film conducteur étant formé d'une couche d'or ou de platine déposée sur une sous-couche de métal recouvrant le support, le traitement de surface est un traitement d'oxydation électrolytique effectué à un potentiel suffisant pour oxyder le métal de la sous-couche.

30 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le métal de la sous-couche est le cuivre.

35 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8 et 9, caractérisé en ce que le traitement de surface comprend de plus la formation

d'une couche mince isolante sur les parties du film conducteur où le métal de la sous-couche a été oxydé.

5 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 et 10, caractérisé en ce que l'on forme cette couche mince isolante au moyen d'un acide organique capable de former avec l'oxyde du métal de la sous-couche un sel insoluble.

10 12. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le traitement de surface consiste à soumettre le film conducteur à l'action d'un plasma gazeux.

15 13. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le traitement de surface consiste à déposer sur le film conducteur une couche organique isolante et à dissoudre ensuite la couche sauf sur les parties du film conducteur qui correspondent à des trous.

20 14. Biocapteur pour la détection de glucose dans le sang, obtenu par le procédé de l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend un support muni d'un film d'or déposé sur une sous-couche de cuivre, le film d'or étant revêtu d'une seule couche monomoléculaire d'acide
25 béhénique ou de distéarylamine couplée à de la glucose oxydase.

30

35

1/1

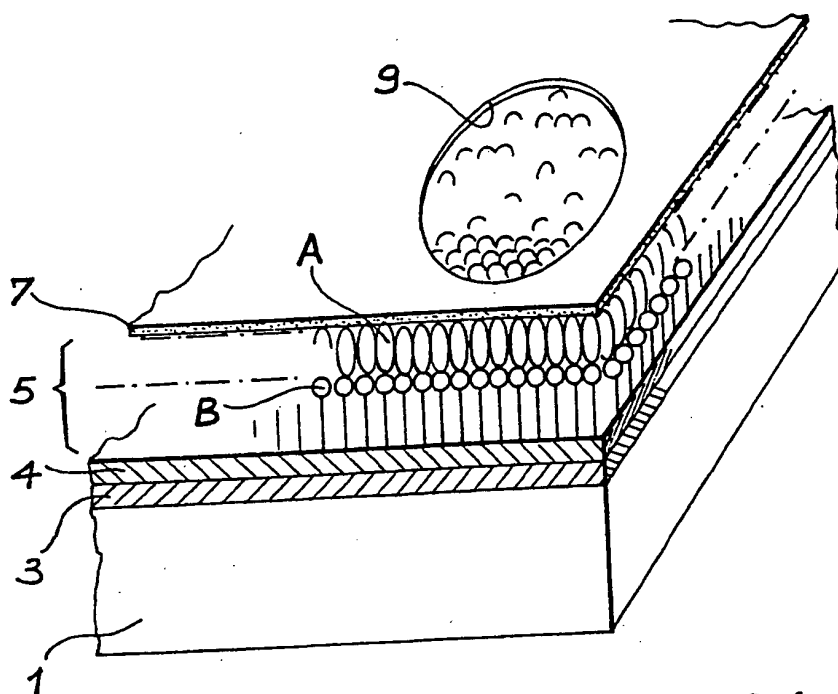


FIG. 1

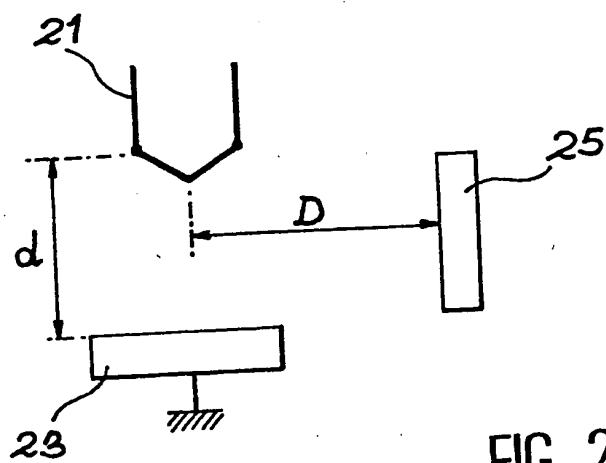


FIG. 2

REPUBLIQUE FRANÇAISE

2682765

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9112764
FA 464028

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	THIN SOLID FILMS. vol. 180, no. 1, 21 Novembre 1989, LAUSANNE CH pages 65 - 72; Y. OKAHATA ET AL.: 'PREPARATIONS OF LANGMUIR-BLODGETT FILMS OF ENZYME-LIPID COMPLEXES: A GLUCOSE SENSOR MEMBRANE'	1-3, 5
A	* le document en entier *	4, 14
A	THIN SOLID FILMS. vol. 180, no. 1, 21 Novembre 1989, LAUSANNE CH pages 293 - 298; SHIGEAKI MIYAUCHI, ET AL.: 'STUDY ON THE CONCENTRATION OF AN ENZYME IMMOBILIZED BY LANGMUIR-BLODGETT FILMS'	1-6, 14
A	THIN SOLID FILMS. vol. 180, no. 1, 21 Novembre 1989, LAUSANNE CH pages 73 - 83; TSUTOMU MIYASAKA ET AL.: 'A NOVEL PHOTOREACTIVE AMPHIPHILE OF NITROPHENYLAZIDE FOR IMMOBILIZATION OF BIOACTIVE PROTEINS'	1-3, 5, 6, 14
D...	THIN SOLID FILMS. vol. 160, 1988, LAUSANNE CH pages 413 - 429; TOYOSAKA MORIIZUMI: 'LANGMUIR-BLODGETT FILMS AS CHEMICAL SENSORS'	1-4, 5, 6, 14
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C12Q
Date d'achèvement de la recherche 23 JUILLET 1992		Examinateur R. A. P. BOSMA
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons * : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 1503 01.91 (P0415)

1/1

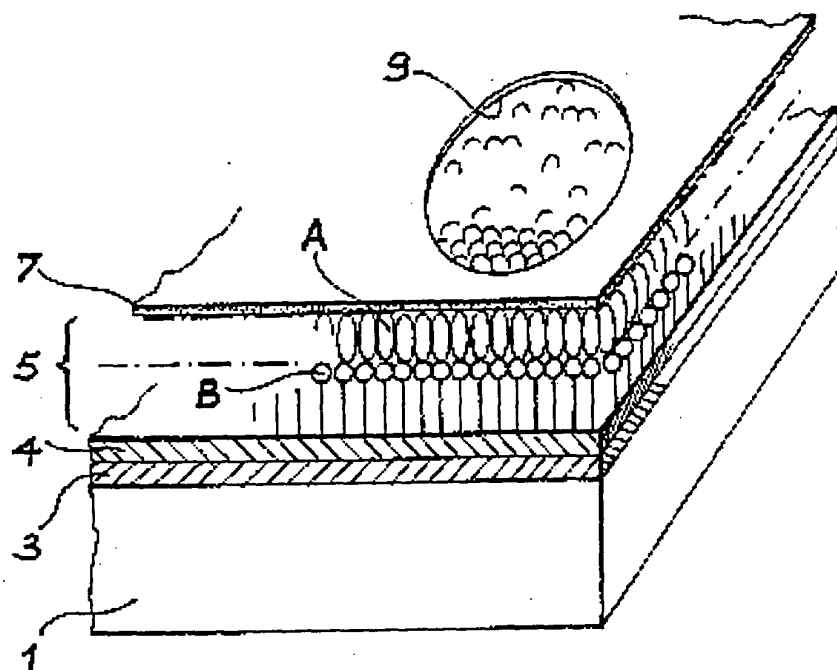


FIG. 1

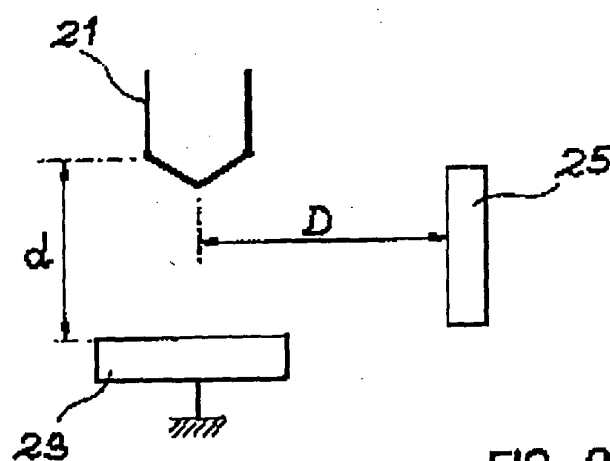


FIG. 2